

研究简报

连续变化法研究 Fe(II) 和 Ferrozine 的相互作用

周日新

张爱乐

(南京大学环境科学系, 南京 210008)

(南京大学药物所, 南京 210008)

关键词: Fe(II) Ferrozine 连续变化法

Ferrozine, 即 3-(2-吡啶基)-5,6-双(4-苯磺酸)-1,2,4-三嗪, 简写成 Fz. 作为一种灵敏的 Fe 光度试剂, 广泛用于生物体系⁽¹⁾和一般材料⁽²⁾中 Fe 的分析. 在反应过程中 Fe(II) 和 Fz 生成 FeFz_3 , 但至今对其相互作用的机理尚不十分清楚. 本文应用连续变化法^(3,4)研究它们之间的相互作用.

实验部分

称取一定量的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 溶解于含 HCl 的去离子水中, HCl 的浓度为 1.2mmolL^{-1} , 使用前用去离子水稀释至 2mmolL^{-1} . Ferrozine 溶液浓度为 10mmolL^{-1} . 缓冲溶液为 HEPES 和 KCl 溶液, 浓度分别为 50mmolL^{-1} 和 100mmolL^{-1} , pH 为 7.6. 所用的水和溶液用前均用纯 N_2 去 O_2 , 以防止 Fe(II) 被氧化. 应用新鲜的 Fe(II) 和 Fz 溶液, 配制一系列初始浓度不同, 但它们的总浓度 $C_0 = [\text{Fe}]_0 + [\text{Fz}]_0$ 保持恒定的溶液, 混匀并放置 10min 后, 测定光吸收. 工作波长为 560nm, 光途长 10cm. C_0 的范围为 $14\text{--}105\mu\text{molL}^{-1}$.

结果和讨论

一. Job Plot

测得的光吸收代表生成的配合物的浓度 Σ , 以此结果对 $[\text{Fe}]_0$ 的摩尔分数 x 作图, $x = [\text{Fe}]_0 / C_0$, 所得结果如图 1 所示. 图中画出了实验点和由电子计算机拟合的理论曲线. 从

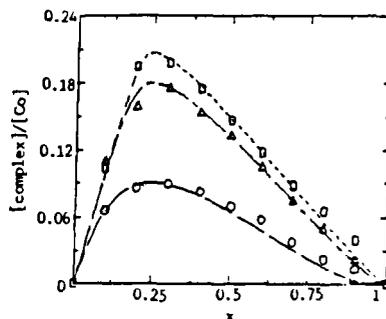


图 1 Job 图
Fig.1 Job Plot

曲线的极大值或极限斜率的交点可算出配合物的结合计量数 $n^{(3)}$, 此处 $n=3$ 。

二. 离解平衡常数

对 Fe(II) 和 Fz 反应体系, 根据上述实验数据, 经计算机处理求得 Fe 和 Fz 配合物的离解平衡常数, $K_d = 7.8 \times 10^{-6}$ 。

三. 反应机理

我们假定了 Fe(II) 和 Fz 作用的三种可能机理, 推导出配合物浓度 Σ 及离解平衡常数和组成之间的关系如下:

1. 设 Fe(II) 和 Fz 反应, 一步生成 FeFz_3 , 即 Fe 和 Fz 的相互作用具有很强的协同性 (cooperativity), Fe 和 Fz 结合生成 FeFz 后, 就容易再与第二、第三个 Fz 结合, 好像 FeFz_3 的生成如同一步完成一样。



令配合物的离解平衡常数为 K_d^3 , 则

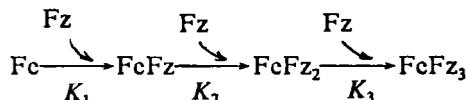
$$K_d = \frac{[\text{Fe}][\text{Fz}]^3}{[\text{FeFz}_3]} = \frac{([\text{Fe}]_0 - \Sigma)([\text{Fz}]_0 - 3\Sigma)^3}{\Sigma}$$

$$= \frac{(C_0 x - \Sigma)[C_0(1-x) - 3\Sigma]^3}{\Sigma}$$

移项展开得

$$27\Sigma^4 - 27[C_0 x + C_0(1-x)]\Sigma^3 + 9[C_0^2(1-x)^2 + 3C_0^2(1-x)x]\Sigma^2 - [K_d^3 + C_0^3(1-x)^3 + 9C_0^3(1-x)^2x]\Sigma + C_0^4(1-x)^3x = 0$$

2. 假定 Fe 和 Fz 生成配合物的反应是分步完成的



生成的各配合物在工作波长下都有吸收, 其吸收信号的大小为: $\text{FeFz} : \text{FeFz}_2 : \text{FeFz}_3 = 1 : 2 : 3$ 。每一步的离解平衡常数分别为 K_1 、 K_2 和 K_3 , 即

$$K_1 = \frac{[\text{Fe}][\text{Fz}]}{[\text{FeFz}]}, \quad K_2 = \frac{[\text{FeFz}][\text{Fz}]}{[\text{FeFz}_2]}, \quad K_3 = \frac{[\text{FeFz}_2][\text{Fz}]}{[\text{FeFz}_3]}$$

这样可得

$$27\Sigma^4 - 27[C_0(1-x) + C_0 x + K_3]\Sigma^3 + 9[C_0^2(1-x)^2 + 3C_0^2(1-x)x + 2K_3 C_0(1-x) + 2K_3 C_0 x + K_2 K_3]\Sigma^2 - [K_1 K_2 K_3 + C_0^3(1-x)^3 + 9C_0^3(1-x)^2x + 3K_3 C_0^2(1-x)^2 + 3K_2 K_3 C_0(1-x) + 12K_3 C_0^2(1-x)x + 3K_2 K_3 C_0 x]\Sigma + [C_0^4(1-x)^3x + 2K_3 C_0^3(1-x)^2x + K_2 K_3 C_0^2(1-x)x] = 0$$

式中 K_1 、 K_2 、 K_3 和 K_d 的关系为 $K_d^3 = K_1 K_2 K_3$ 和 $\Sigma = \frac{1}{3}([\text{FeFz}] + 2[\text{FeFz}_2] + 3[\text{FeFz}_3])$ 。

3. 反应分步进行, 但只有 FeFz_3 在工作波长下有吸收, 而 FeFz 和 FeFz_2 均无吸收, 这样有

$$27\Sigma^4 - 27[C_0(1-x) + C_0 x + K_3]\Sigma^3 + 9[C_0^2(1-x)^2 + 3C_0^2(1-x)x + 2K_3 C_0(1-x) + K_2 K_3]\Sigma^2 - [K_1 K_2 K_3 + C_0^3(1-x)^3 + 9C_0^3(1-x)^2x + 3K_3 C_0^2(1-x)^2 + 3K_2 K_3 C_0(1-x)]\Sigma + C_0^4(1-x)^3x = 0$$

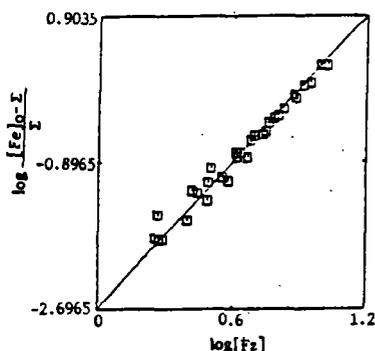
应用电子计算机处理的结果, 对于机理(1), 所有实验点全部都较好地落在理论曲线上, $K_d = 7.8 \times 10^{-6}$; 对于机理(2), 实验点和理论曲线符合程度较差, 并需要假定有强的协同作用

存在, 例如 $K_1 = 130K_2$, $K_2 = 400K_3$; 而按机理(3), 实验点和理论曲线的符合程度在上述两者之间. 因而可以认为, Fe(II)和 Fz 的结合具有极强的协同性.

4. Hill Plot

Hill Plot 广泛用于确定反应体系的协同性⁽⁵⁾. 实验结果以 $\lg \frac{[\text{Fe}]_0 - \Sigma}{\Sigma}$ 对 $\lg[\text{Fz}]$ 作图得图 2. 根据图中直线的斜率得 $n = 3$, $K_d = 7.9 \times 10^{-6}$. 如果反应的协同性不是足够强, 则从 Hill Plot 求得的 n 就会小于配合物的结合计量数⁽⁶⁾. 对于 Fe(II)和 Fz 这一体系, 连续变化法求得的结合计量数为 3, 从 Hill Plot 法求得的 n 也正好等于 3, 说明 Fe(II)和 Fz 的反应的确是无限协同的.

图 2 Hill 图
Fig.2 Hill Plot



致谢: 本文的实验和计算工作是在美国国立健康研究院(NIH)完成的, 得到 P.B.Chock 教授和 C.Y.Huang 教授的指导和帮助, 谨此致谢.

参 考 文 献

- [1] Carter, P., *Anal. Biochem.*, **40**, 450 (1971).
- [2] 童沈阳、张宝新, *分析化学*, **11**, 927 (1982).
- [3] Huang, C.Y., *Methods in Enzymol.*, **87**, 509 (1982).
- [4] Chock, P.B., Huang C.Y., Zhou Rixin, *ASCB / ASBMB Joint Meeting, San Francisco* BG 497 (1989).
- [5] 陶慰孙等, *蛋白质分子基础*, 高等教育出版社, p.388 (1987).
- [6] 周日新、张爱乐, *化学通报*, No.4, 20 (1992).

STUDY OF MECHANISM OF Fe(II)-FERROZINE INTERACTION BY CONTINUOUS VARIATION METHOD

Zhou Rixin

Zhang Aile

(Department of Environment Science) (Institute of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210008)

Application of the continuous variation method for determining stoichiometry and binding mechanism to Fe-Fz systems has been treated. The results were analyzed according to three plausible models. Computer analysis revealed that the mechanism is most consistent with a strong cooperativity.

Keywords: Fe(II) ferrozine continuous variation method